

补肾和脉方对老年自发性高血压大鼠下丘脑蛋白质组学的影响*

史琳 杨传华[△]

(山东中医药大学附属医院, 山东 济南 250011)

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1004-745X(2024)02-0209-07

doi: 10.3969/j.issn.1004-745X.2024.02.005

【摘要】 目的 探寻补肾和脉方治疗老年自发性高血压病的可能分子机制。**方法** 选取16月龄雄性自发性高血压大鼠(SHR),采用随机数字表法随机分为2组:补肾和脉方组[10只,补肾和脉方生药浓度14.22 g/(kg·d)]和模型组(10只,生理盐水2 mL/d),以10只同龄雄性WKY大鼠作为正常对照组(生理盐水2 mL/d),共灌胃干预8周。定期观察并监测记录大鼠的收缩压和舒张压。干预结束后,取各组大鼠血清、下丘脑。ELISA法检测血清中神经肽(NPY)、去甲肾上腺素(NE)、C反应蛋白(CRP)和血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)的含量。Label-free定量蛋白质组学测序分析方法筛选下丘脑蛋白质表达谱的变化,通过生物信息学对差异蛋白进行GO富集分析,并对差异蛋白的分子功能、细胞成分和生物学途径3个方面进行功能方面的注释;对差异蛋白进行KEGG通路分析得到补肾和脉方靶蛋白及其涉及的信号通路;同时建立差异蛋白的互作网络综合分析补肾和脉方的药理机制,进而为研究老年自发性高血压寻找新的药物标志蛋白提供理论和思路。**结果** 1)补肾和脉方能够稳步降低老年自发性高血压大鼠的收缩压、舒张压、脉压差和平均动脉压;降低大鼠血清NPY、NE、CRP、AngⅡ的水平,在一定程度上改善高血压的血管重塑。2)与模型组相比,应用补肾和脉方干预后的大鼠下丘脑中检出2 753个差异蛋白点,其中316个蛋白有统计学差异($P<0.05$),201个蛋白表达升高,115个蛋白表达降低;差异蛋白主要富集于转运酶活性和离子通道活性方面。3)补肾和脉方干预老年SHR下丘脑的节点蛋白Cdc42、SIRT2、Ptk2b的表达与蛋白质组学一致。**结论** 补肾和脉方治疗老年自发性高血压的分子机制可能与其促进神经元细胞活力,维持动脉血管的稳定性等有关。

【关键词】 老年自发性高血压病 补肾和脉方 下丘脑 蛋白质组学 大鼠

Effect of Bushen Hemai Decoction on Hypothalamic Proteomics in Rats with Elderly Spontaneous Hypertension Shi Lin, Yang Chuanhua. The Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Shandong, Jinan 250011, China.

【Abstract】 Objective: To investigate the possible molecular mechanism of *Bushen Hemai Decoction* in the treatment of elderly spontaneous hypertension in rats. **Methods:** Male spontaneous hypertension rats (SHR) of sixteen-month-old were randomly divided into two groups: *Bushen Hemai Decoction* group (10 rats, with a crude drug concentration of 14.22 g/(kg·d) and model group (10 rats, 2 mL/d of normal saline), and 10 male WKY rats of the same age were used as normal control group (2 mL/d of normal saline). All received gavage for 8 weeks. The systolic and diastolic blood pressure of the rats were observed and monitored regularly. After the intervention, serum and hypothalamus were collected from each group. The contents of neuropeptide Y (NPY), norepinephrine (NE), C-reactive protein (CRP) and angiotensin Ⅱ (Ang Ⅱ) in serum were detected by ELISA. Label-free quantitative proteomics sequencing analysis method were used to screen the changes in hypothalamic protein expression profile, and GO enrichment analysis of differential proteins were performed by bioinformatics, the molecular function of differential proteins were analyzed, the functional aspects of cellular components and biological pathways were annotated, the KEGG pathway analysis of the differential proteins was carried out to obtain the target proteins of *Bushen Hemai Decoction* and the signaling pathways involved, and the interaction network of differential proteins was established to comprehensively analyze the pharmacological mechanism of *Bushen Hemai Decoction*, so as to provide theories and ideas for the study of new drug marker proteins in the study of senile spontaneous hypertension. **Re-**

* 基金项目: 山东省自然科学基金项目(ZR2019QH016); 山东省中医药科技发展计划项目(2019-0100)

[△]通信作者

results: 1) *Bushen Hemai Decoction* could steadily reduce the systolic blood pressure, diastolic blood pressure, pulse pressure difference and mean arterial pressure in rats with elderly spontaneous hypertension, and reduce the serum levels of NPY, NE, CRP and Ang II, and improve the vascular remodeling of hypertension to a certain extent. 2) Compared with the model group, a total of 2 753 differential protein points were detected in the hypothalamus of rats after the intervention of *Bushen Hemai Decoction*, of which 316 proteins were statistically different, 201 proteins were increased and 115 proteins were decreased. 3) The expressions of node proteins Cdc42, SIRT2 and Ptk2b in the hypothalamus of SHR were consistent with proteomics. **Conclusion:** The molecular mechanism of *Bushen Hemai Decoction* in the treatment of elderly spontaneous hypertension may be related to its promotion of neuronal cell vitality and maintenance of arterial vascular stability.

[Key words] Elderly spontaneous hypertension; *Bushen Hemai Decoction*; Hypothalamus; Proteomics; Rat

老年高血压多以收缩压升高、脉压差大、血压昼夜节律异常、易发生直立性低血压和并发症多等为特征^[1],是脑出血、脑梗死、阿尔兹海默病、心力衰竭、肾功能衰竭等最常见的基础病因,也是诱发心脑血管意外疾病的主要原因。从中医角度而言,高血压属于中医学“眩晕病”范畴,“肾虚”为老年高血压病机之本,“络脉自病”为老年高血压的病机。杨传华教授在多年的临床实践和实验研究中,总结并提出了老年高血压的病机关键在于“肾气亏虚,血脉自病”“补肾气,和血脉”的重要治疗方法,制定补肾和脉方。既往研究证实补肾和脉方可有效地降低老年高血压患者24 h血压、脉压、脉搏波速度,明显改善左室舒张功能、大动脉弹性和功能,对老年高血压、高血压肾虚证的疗效甚佳^[2-5]。本研究旨在通过观察补肾和脉方对老年自发性高血压大鼠下丘脑蛋白质组学的干预作用,探寻补肾和脉方的分子机制。现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级16月龄雄性自发性高血压大鼠(SHR)20只,体质量347~372 g,同月龄雄性血压正常的WKY大鼠10只,体质量482~502 g。SHR和WKY均购自北京维通利华实验动物技术有限公司,经动物检验、检疫合格。动物合格证编号:SCXK(京)2012-0001。

1.2 药物

补肾和脉方组成:生黄芪15 g,黄精15 g,桑寄生15 g,女贞子15 g,怀牛膝15 g,炒杜仲15 g,泽泻9 g。药材均购自山东中医药大学附属医院中药房,由医院煎药室统一煎制浓缩。

1.3 仪器及试剂

全自动大小鼠无创血压测量系统(型号:BP-300A),成都泰盟公司;96孔型PCR仪(型号:Arktik Thermal Cycler),美国Thermo Scientific公司;实时荧光定量PCR仪(型号:LightCycler 480 II),美国Roche集团;低速自动平衡离心机(型号:ST8),美国Thermo Scientific公司;高速冷冻离心机(型号:5424R),德国Eppendorf公司;涡旋振荡器(型号:QL-901),海门市其林贝尔仪器制造有限公司;离心机(型号:PICO17),美国

Thermo Scientific公司;超声波细胞破碎仪(型号:XO),南京先欧仪器制造有限公司;酶标仪(型号:Multiskan MK3),Thermo;恒温孵浴器(型号:HH.S4),上海浦东荣丰科学仪器有限公司;10K超滤管(型号:PN:UFC5010BK),Milipore;高效液相色谱仪(型号:EASY-nLC 1000 System),Thermo Scientific;质谱系统(型号:Q-Exactive),Thermo。RNA提取试剂TRIzol,美国Invitrogen公司;逆转录试剂盒,M-MLV逆转录酶,Invitrogen公司;dNTP,OligodT, Promega公司;2XTaq PCR Master Mix,天根生化科技(北京)有限公司;山羊超敏二步法免疫组化检测试剂盒,编号PV 9003,北京中杉金桥生物技术有限公司;酶底物显色剂DAB显色试剂盒;丹麦DAKO,基因科技(上海)有限公司;封闭血清,羊封闭血清原液,北京中杉金桥生物技术有限公司;Cdc42兔多克隆抗体(型号:10155-1-AP),SIRT2兔多克隆抗体(型号15345-1-AP),PYK2兔多克隆抗体(型号:17592-1-AP),辣根酶标记山羊抗小鼠IgG(H+L)ZB-2305,辣根酶标记山羊抗兔IgG(H+L)ZB-2301,DAB显色试剂盒ZLI-9018,北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.4 给药方法

补肾和脉方组给予药物浓度为14.22 g/(kg·d),模型组和正常对照组给予等量生理盐水,给药容积为10 mL/kg,每天上午定时灌胃给药,每周给药6 d,连续8周。

1.5 标本采集与检测

1.5.1 血压 整个实验周期采用尾套式尾动脉加压法测量大鼠清醒和安静状态下的血压,包括收缩压、舒张压、脉压差、平均动脉压。

1.5.2 血清中神经肽(NPY)、去甲肾上腺素(NE)、C反应蛋白(CRP)和血管紧张素Ⅱ(Ang Ⅱ) ELISA法检测 大鼠血清中NPY、NE、CRP和Ang Ⅱ的浓度。

1.5.3 下丘脑蛋白质组学 1)组织蛋白提取:干预结束后处死动物,取下丘脑组织,剪碎后用4℃预冷的生理盐水反复冲洗。加入适量的液氮,按照1:10(W/V)加入样品裂解缓冲液(7 mol/L尿素,2 mol/L硫脲,0.1% CHAPS)及蛋白酶抑制剂PMSF研磨。4℃,15 000 r/min,离心15 min,吸取上清,分装后,置于-80℃保存。2)

蛋白定量(蛋白质浓度测定):采用Bradford法(考马斯亮蓝法)测定样本蛋白浓度。准备标准曲线,设置10个管的标准品,每孔依次加0.2 μg/μL BSA为0、2、4、6、8、10、12、14、16、18 μL,补加PBS至最终体积为20 μL,各孔浓度为0.4、0.8、1.2、1.6、2、2.4、2.8、3.2、3.6 μg蛋白。将样本按照说明书用裂解缓冲液(7 mol/L尿素,2 mol/L硫脲,0.1% CHAPS)稀释至一定倍数,使终浓度落在测量范围内,稀释好的样本和标准品的每个样品各取10 μL至管中。加300 μL蛋白定量染料,避光,室温孵育20 min。595 nm测量吸光度,绘制标准曲线。依据标准曲线计算出样品浓度。3)蛋白酶解:蛋白定量后取200 μg蛋白溶液置于离心管中,加入终浓度为25 mmol/L DTT,60℃反应1 h;反应后加入终浓度50 mmol/L碘乙酰胺,室温10 min。将还原烷基化后的蛋白溶液加入10 K的超滤管中,12 000 r/min离心20 min,弃掉收集管底部溶液。加入溶解缓冲液100 μL,12 000 r/min离心20 min,弃掉收集管底部溶液,重复3次。更换新的收集管,在超滤管中加入胰蛋白酶,总量4 μg(与蛋白质量比1:50),体积50 μL,37℃反应过夜。12 000 r/min离心20 min,将酶解消化后的肽段溶液离心于收集管底部;在超滤管中加入50 μL溶解缓冲液,12 000 r/min再次离心20 min,与上一步合并,收集管底部共得到100 μL酶解后的样品。冻干待上样。4)钠升级反相色谱-Q Exactive进行蛋白质分析:将高PH反相分离得到的组分用20 μL 12%甲醇,0.1%甲酸复溶;12 000 r/min离心10 min,吸取上清上样;上样体积10 μL,采取夹心法上样;Loading Pump流速350 nL/min,15 min;分离流速300 nL/min,分离梯度见表1。

表1 分离梯度

时间(min)	流动相B比例(%)
0	5
0	5
13	8
90	30
100	50
105	95
115	95
116	5
126	5

质谱数据分析:选择SwissProt数据库,质谱分析由Thermo Q-Exactive型质谱完成。使用Western blotting分析验证差异蛋白结果。具体步骤:12% SDS-PAGE,上样量为40 μg;电转印后,以5%脱脂奶的TBST室温封闭1h。加入Cdc42(1:1 000稀释)、SIRT2(1:500稀释)、Ptk2b(1:500稀释),以GAPDH为内参,4℃孵育过

夜。次日,1×TBST洗涤5 min×5次,加入山羊抗兔IgG二抗(1:10 000)室温孵育1.5 h,1×TBST洗涤5 min×4次。ECL显色,Fluor Chem Q下曝光、条带半定量分析。

1.6 统计学处理

应用SPSS 23.0统计软件。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用student's *t*检验,有重复测量的资料进行重复测量方差分析或多元方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠血压比较

见表2。与正常对照组相比,模型组大鼠收缩压、舒张压、脉压差、平均动脉压均显著升高($P < 0.05$);与模型组相比,补肾和脉方组大鼠收缩压、舒张压、脉压、平均动脉压均显著下降($P < 0.05$)。

表2 各组大鼠血压比较(mmHg, $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	收缩压	舒张压	脉压差	平均动脉压
正常对照组	10	122.33±1.59	76.29±2.79	45.57±1.88	91.86±1.94
模型组	10	193.51±1.82*	133.09±1.30*	60.48±1.73*	153.19±1.20*
补肾和脉方组	10	164.53±1.34 ^Δ	112.58±0.82 ^Δ	52.06±1.72 ^Δ	131.21±3.49 ^Δ

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,^Δ $P < 0.05$ 。下同。1 mmHg≈0.133 kPa。

2.2 各组大鼠血清NPY、NE、CRP、Ang II表达比较

见表3。与正常对照组相比,模型组大鼠NPY、NE、CRP、Ang II均显著升高($P < 0.05$);与模型组相比,补肾和脉方组大鼠NPY、NE、CRP、Ang II均显著下降($P < 0.05$)。

表3 各组大鼠血清NPY、NE、CRP、Ang II表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	NPY(pg/mL)	NE(pg/mL)	CRP(μg/mL)	Ang II(ng/L)
正常对照组	10	120.01±7.37	192.02±5.82	4.29±0.62	142.28±5.68
模型组	10	146.66±8.74*	214.27±7.56*	9.71±0.82*	188.06±8.18*
补肾和脉方组	10	130.06±8.34 ^Δ	201.92±7.16 ^Δ	6.13±0.75 ^Δ	166.02±6.25 ^Δ

2.3 各组大鼠下丘脑蛋白质组学情况

与模型组相比,补肾和脉方组大鼠的下丘脑中共检出2 753个差异蛋白点,其中有316个蛋白有统计学差异($P < 0.05$),其中201个蛋白表达升高,115个蛋白表达降低。下丘脑差异最大的前30个蛋白为:Acan、Serpinh1、Nub1、Slc25a25、Hapln1、Syt2、Rpl23、Pvalb、Ahnak、Uqcrh、Nbas、Cpm、Ggt7、Sez6l、Aarsd1、Lgi3、Esys1、Nefh、Ptges2、Cst3、Cdc42、Metap2、Mag、RGD1302996、Pacsln3、Epm2a1p1、Tfrc、Tstd3、Coq9、Gabra2(均为表达上调);Dgkb、Vps51、C2cd2l、Limch1、Ptk2b、Lactb、Npy、Cpne7、Arhgap21、Cpne5、Trio、Golga2、Ccadc177、Nop56、Sarm1、Ntrk2、Sec16a、Adgrg1、Dclk1、Nup50、Chgb、Ngef、Coro2a、Rab3b、Btbd8、Zc2hc1a、

Txndc12、Wfs1、Ift172、Syngap1(均为表达下调)。

2.3.1 下丘脑差异蛋白功能分析 下丘脑中差异蛋白主要集中在转运酶活性和离子通道活性方面(表4),差异蛋白主要集中在细胞质和细胞膜方面(表5);生物学功能主要集中在代谢、磷酸化和发育方面(表6、图1)。

表4 下丘脑中蛋白分子功能注释分类

Term	Term	Count	P-Value
transporter activity	转运活性	19	0.041
substrate-specific transporter activity	底物特异性转运体活性	15	0.047
substrate-specific transmembrane transporter activity	底物特异性跨膜转运蛋白活性	14	0.025
ion transmembrane transporter activity	离子跨膜转运蛋白活性	13	0.031
inorganic cation transmembrane transporter activity	无机阳离子跨膜转运蛋白活动	9	0.038
ligase activity	连接酶活性	9	0.038
monovalent in organic cation transmembrane transporter activity	单价有机阳离子跨膜转运蛋白活性	8	0.016
metal ion transmembrane transporter activity	金属离子跨膜转运蛋白活性	7	0.017
ion channel activity	离子通道活动	7	0.023
gated channel activity	门控通道活动	6	0.041
electron carrier activity	电子载体活性	5	0.039
aminoacyl-tRNA ligase activity	氨酰-tRNA连接酶活性	5	0.039
voltage-gated potassium channel activity	电压门控型钾离子活性	4	0.004
hyaluronic acid binding	透明质酸结合	4	0.009
carbohydrate binding	碳水化合物结合	4	0.047
protein kinase regulator activity	蛋白激酶调节活性	3	0.004
GABA receptor activity	GABA受体活性	3	0.011
calcium-dependent phospholipid binding	钙依赖性磷脂结合	3	0.033
acylphosphatase activity	酰基磷酸酶活性	2	0.005
sodium;amino acid symporter activity	钠:氨基酸转运体活性	2	0.016
GABA-A receptor activity	GABA-A受体活性	2	0.047
monosaccharide binding	单糖结合	2	0.047

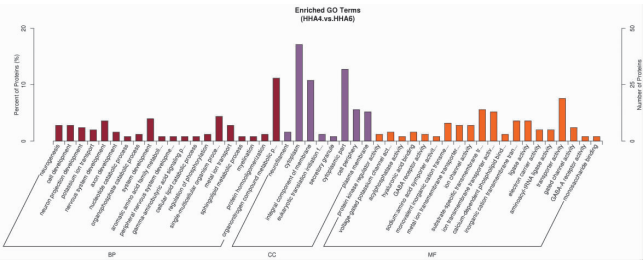
表5 下丘脑中蛋白细胞定位注释分类

Term	Term	Count	P-Value
cytoplasm	细胞质	43	0.009
cytoplasmic part	细胞质部分	32	0.033
integral component of membrane	膜的整体组分	27	0.017
cell periphery	细胞外周	14	0.034
plasma membrane	质膜	13	0.037
neurofilament	神经丝	4	0.000
eukaryotic translation initiation factor 3 complex	真核翻译起始因子3复合物	3	0.024
secretory granule	分泌颗粒	2	0.030

2.3.2 下丘脑KEGG 通路分析 见表7、图2。采用DAVIA网站分析了差异蛋白在KEGG通路中的富集情况。结果如下,与模型组相比,补肾和脉方干预后的

表6 下丘脑中蛋白生物学途径注释分类

Term	Term	Count	P-Value
organonitrogen compound metabolic process	有机氮化合物代谢过程	28	0.035
cellular component organization	元胞组织	28	0.046
phosphorylation	磷酸化	18	0.043
single-multicellular organism process	单细胞多细胞生物过程	11	0.025
system development	系统开发	10	0.008
nervous system development	神经系统发育	9	0.002
neurogenesis	神经形成	7	0.001
cell development	细胞发育	7	0.001
metal ion transport	金属离子运输	7	0.029
single-organism catabolic process	有机体分解代谢过程	7	0.037
neuron projection development	神经元投影发展	6	0.001
potassium ion transport	钾离子运输	5	0.002
regulation of cellular metabolic process	调节细胞代谢过程	5	0.039
axon development	轴突发育	4	0.003
membrane organization	膜组织	4	0.047
organophosphate catabolic process	有机磷分解代谢过程	3	0.007
regulation of phosphorylation	磷酸化调节	3	0.017
protein homooligomerization	蛋白质同质齐聚	3	0.033
synapse organization	突触组织	3	0.043
aromatic compound catabolic process	芳香族化合物分解代谢过程	3	0.043
cellular nitrogen compound catabolic process	细胞氮化合物分解代谢过程	3	0.043
heterocycle catabolic process	杂环分解代谢过程	3	0.043
organic cyclic compound catabolic process	有机环化合物分解代谢过程	3	0.043
nucleotide catabolic process	核苷酸分解代谢过程	2	0.005
aromatic amino acid family metabolic process	芳香族氨基酸家族代谢过程	2	0.016
peripheral nervous system development	周围神经系统发育	2	0.016
gamma-aminobutyric acid signaling pathway	γ-氨基丁酸信号通路	2	0.016
cellular lipid catabolic process	细胞脂质分解代谢过程	2	0.016
sphingolipid metabolic process	鞘脂代谢过程	2	0.030
myelination	髓鞘形成	2	0.030
actin cytoskeleton reorganization	肌动蛋白细胞骨架重组	2	0.047
neurological system process	神经系统过程	2	0.047



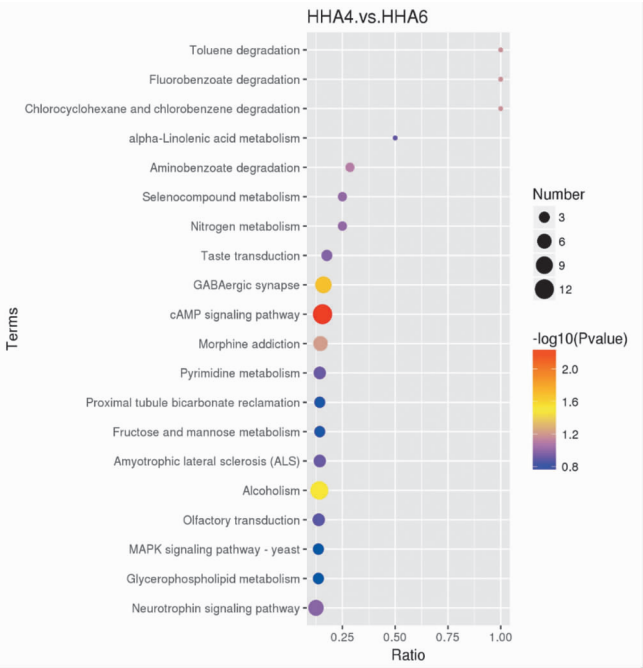
注:HHA4为补肾和脉方组大鼠下丘脑;HHA6为模型组大鼠下丘脑

图1 下丘脑中差异蛋白的GO富集分析

SHR下丘脑中差异蛋白涉及的信号通路涉及cAMP信

表7 下丘脑中差异蛋白信号通路

Term	Term	Count	P-Value	Protein
cAMP signaling pathway	cAMP信号通路	12	0.005	PPP1R12A, MYPT1;CALM;CAMK2;ATP2B;ACOX1, ACOX3;HCN2;CAMK2;NPY;PPP1C;ATP1A;ADRB2
GABAergic synapse	GABA突触	8	0.020	GNAI;glnA;GABARAP,ATG8,LC3;GNAI;GABRA;PLCL1,PRIP;GABBR
Alcoholism	酒精中毒	10	0.029	IGH;RAC1;ITGA5,CD49e;HGS,HRS,VPS27;DYNC1H;STX7;RAB5A;LAMP1_2,CD107;MHC1;TUBB;SEC22;CORO1A

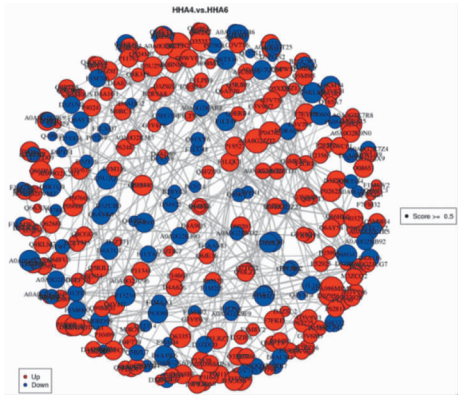


注: HHA4为补肾和脉方组大鼠下丘脑; HHA6为模型组大鼠下丘脑

图2 下丘脑中差异蛋白信号通路

号传导途径、GABA 突触和酒精中毒通路。

2.3.3 String 网络数据库建立差异蛋白互作网络 通过 String 在线数据库分析差异蛋白的互作网络, 具体分析结果如图3所示。



注: HHA4为补肾和脉方组大鼠下丘脑; HHA6为SHR模型组大鼠下丘脑

图3 下丘脑中String蛋白互作网络

2.4 各组大鼠下丘脑差异蛋白的 mRNA 相对表达水平比较

见表7。与正常对照组相比,模型组大鼠 Cdc42、SIRT2 mRNA 水平显著下降($P<0.05$), Ptk2b mRNA 相

表7 各组大鼠下丘脑差异蛋白的 mRNA 相对表达水平比较 (分, $\bar{x}\pm s$)

组别	Cdc42	SIRT2	Ptk2b
正常对照组	1.00±0.04	1.00±0.04	1.00±0.09
模型组	0.30±0.10*	0.58±0.12*	4.13±0.16*
补肾和脉方组	0.77±0.18 [△]	0.87±0.10 [△]	2.16±0.45 [△]

对表达水平均显著升高($P<0.05$);与模型组相比,补肾和脉方组大鼠 Cdc42、SIRT2 mRNA 相对表达水平显著升高($P<0.05$)及 Ptk2b mRNA 相对表达水平均显著降低($P<0.05$)。

3 讨论

老年高血压病的病机在于“肾虚为本,络脉自病”,肾虚为病机根本,标实为痰浊瘀血,属本虚标实之证。高血压病多起病隐匿,病程较长,“初病在气,久病在血;初病在经,久病入络”,络脉“沟通表里、渗灌气血”,而络病久、瘀、顽、杂,使得疾病迁延难愈。治疗原则应遵循“平衡阴阳,调整气血”。治法上应补益肾气,调和血脉。方中重用生黄芪为君药,“补一身之虚”,气血通畅调达,络脉自和,乃补肾和脉之首要,配合黄精、桑寄生,共奏滋肾填精、补肾通络之功。“善补阳者,必于阴中求阳,则阳得阴助,而生化无穷;善补阴者,必于阳中求阴,则阴得阳升,而泉源不竭”,故方中臣以女贞子、炒杜仲合用以阴阳双补,平补肾之阴阳气血,使肾气充盛,怀牛膝引血下行,佐以甘寒之泽泻,补肾虚,泄肾浊,既能降湿浊,又可制约温燥诸药化热伤津、防补品滋腻恋邪之弊。纵观本方,共奏补肾益气、阴阳双补、活血行气通络之功。

下丘脑是血压调节的内分泌系统和神经系统的接口,下丘脑室旁核(PVN)是通过调节心血管、神经内分泌和其他功能来维持体内平衡的关键区域^[6]。有证据支持下丘脑神经元活动的改变是导致交感神经驱动力增加和血压升高的主要因素^[7],下丘脑可以调节中枢神经元信号传导、炎症反应、氧化应激、血管紧张素分泌等过程。

本研究显示,GO 功能富集分析提示下丘脑中差异蛋白主要集中在转运酶活性、离子通道活性、代谢、磷酸化和发育方面;差异蛋白主要集中分布在细胞质和细胞膜方面。采用 DAVIA 网站分析差异蛋白在 KEGG 通路中的富集情况,发现与 SHR 模型组相比,补肾和脉方干预后的 SHR 大鼠下丘脑中差异蛋白有关的信

号通路涉及cAMP信号传导途径、GABA突触和酒精中毒通路。cAMP信号通路在代谢、分泌、钙稳态、肌肉收缩、细胞命运和基因转录方面具有重要的调节作用。cAMP是最普遍和多功能的第二信使之一,cAMP信号通路对于细胞适应复杂环境的过程非常重要,涉及多个下游信号分子家族,例如G蛋白偶联受体(GPCRs),鸟嘌呤核苷酸结合蛋白(G蛋白),腺苷酸环化酶(AC),PDE和包括A型激酶锚定蛋白(AKAPs)在内的支架蛋白等^[8]。cAMP在细胞中的功能主要由蛋白激酶A(cAMP依赖的蛋白激酶EPAC)和直接由cAMP激活的交换蛋白(cAMP调节的鸟嘌呤核苷酸交换因子cAMP-GEF)执行。cAMP可以严密地监控包括代谢、分泌和肌肉收缩在内的多种生理病理过程,在血压的调节过程中具有重要的作用^[9]。GPCRs是cAMP信号通路中重要的分子,是治疗高血压的重要靶标。GPCRs通过转导激素信号改变细胞内第二信使水平、效应酶和通道活性。第二信使的降低可以抑制血管的扩张^[10]。下丘脑神经元细胞通过分泌抗利尿激素,增加肾脏对水的重吸收和收缩血管,增加血压。当血压升高时,压力反射通过激活 γ -氨基丁酸(GABA)抑制血管升压素神经元活动,进而降低血压。

Cdc42编码了含191个氨基酸、21.3 kDa的小GTPase蛋白质,属于Ras GTP酶超级家族中的Rho家族。Cdc42参与肌动蛋白和细胞极性的调节。Cdc42与多种细胞过程密切相关,如轴突髓鞘、细胞内转运、基因转录、细胞周期调控和细胞命运的调控。Cdc42还参与细胞迁移和趋化,主要包括巨噬细胞,T细胞,成纤维细胞等^[11]。在原发性小鼠胚胎成纤维细胞中,Cdc42的缺失会导致异常细胞的扩散,减少对纤维蛋白的黏附,导致伤口愈合的缺陷,并随血清梯度下降其趋化性减弱^[12]。有研究发现SIRT2在神经生长和神经细胞神经活动的调节中发挥作用^[13]。研究发现,Ang II和机械拉伸通过SIRT2刺激内皮细胞的微管再分布和去乙酰化,在高血压诱导的血管重塑中发挥重要作用^[14]。Ptk2b与高血压密切相关。与正常血压小鼠相比,神经源性高血压小鼠下丘脑中Ptk2b表达明显减低^[15]。Ang II诱导的Ptk2b磷酸化促进VSMC增殖^[16]。Ang II通过细胞膜上GPCR受体信号传导,激活pyk2(ptk2b),通过MAPK信号通路,磷酸化MEK和ERK,间接促进细胞增殖和细胞分化。大样本的高血压人群研究显示Ptk2b与高血压相关^[17]。有研究显示血管紧张素、血管收缩、钠/钾调节与Ptk2b相关^[18]。

因此,研究发现补肾和脉方对下丘脑的保护可能是通过上调Cdc42从而促进神经元细胞活力实现的。SIRT2可能通过抑制炎症反应和促进细胞的活力促进下丘脑组织的功能进而影响大鼠的血压。Ptk2b可能

通过改变下丘脑神经元细胞活力对下丘脑起到保护作用,进而延缓高血压病的发生。

参 考 文 献

- [1] 牛瑞红,李丰,姜静.老年高血压病诊断与治疗研究进展[J].人民军医,2017,60(5):507-511.
- [2] 陆峰,杨传华,王震,等.补肾和络方对老年单纯收缩期高血压的疗效及其安全性评价[J].河南中医,2007,27(11):28-31.
- [3] 陆峰,杨传华,王震,等.补肾和脉方联合降压治疗对老年单纯收缩期高血压患者左室肥厚的影响[J].山东医药,2010,50(9):50-51.
- [4] LU F, HUO Q, WANG Z, et al. Effects of bushen hemai prescription for senile ISH: a randomised, single-blind trial[J]. J Am Coll Cardiol (Suppl.), 2014, 64(16): C177.
- [5] 霍青,陆峰,杨传华,等.补肾和脉方对老年单纯收缩期高血压动态血压的影响[J].山东中医药大学学报,2010,34(3):216-218.
- [6] ZHOU JJ, MA HJ, SHAO JY, et al. Impaired hypothalamic regulation of sympathetic outflow in primary hypertension[J]. Neurosci Bull, 2019, 35(1): 124-132.
- [7] GERALDES V, LARANJO S, ROCHA I. Hypothalamic ion channels in hypertension[J]. Curr Hypertens Rep, 2018, 20(2):14.
- [8] CHEN B, CALVERT AE, MENG XM, et al. Pharmacologic agents elevating cAMP prevent arginase II expression and proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2012, 47(2):218-226.
- [9] BERGANTIN LB. Hypertension, diabetes and neurodegenerative diseases: is there a clinical Link through the Ca^{2+} /cAMP signalling interaction[J]. Curr Hypertens Rev, 2019, 15(1):32-39.
- [10] TUTUNEA FATAN E, CAETANO FA, GROS R, et al. GRK2 targeted knock-down results in spontaneous hypertension, and altered vascular GPCR signaling[J]. J Biol Chem, 2015, 290(8):5141-5155.
- [11] KISO M, TANAKA SN, SAJI S, et al. Long isoform of VEGF stimulates cell migration of breast cancer by filopodia formation via NRPI/ARHGAP17/Cdc42 regulatory network[J]. Int J Cancer, 2018, 143(11):2905-2918.
- [12] LIU YY, LV JD, LIANG XY, et al. Fibrin stiffness mediates dormancy of Tumor-Repopulating cells via a Cdc42-Driven Tet2 epigenetic program[J]. Cancer Res, 2018, 78(14):3926-3937.
- [13] PANDITHAGE R, LILISCHKIS R, HARTING K, et al. The regulation of SIRT2 function by cyclin-dependent kinases affects cell motility[J]. J Cell Biol, 2008, 180(5):915-929.
- [14] HASHIMOTO KOMATSU A, HIRASE T, ASAKA M, et al. Angiotensin II induces microtubule reorganization mediated by a deacetylase SIRT2 in endothelial cells[J]. Hypertens Res, 2011, 34(8):949-956.

(下转第239页)

菀陈莖”之意。因此,临证应方证结合,有是证,用是方,以求“疏其气血,令其调达,而致和平”之效。

4 结 语

偏头痛是临床中较为顽固的疾病,其反复发作且不易缓解,病位在少阳,若少阳枢机不利,气机郁滞、脾胃升降失常、阳气失于布散、推陈致新失常均可导致脑络不通而为偏头痛。因此,临证治疗偏头痛,首当和解少阳,使枢机得利,再结合舌脉,明辨病邪性质,合理选方,重在少阳,又非仅限于少阳,可将柴胡剂与其他经方联合使用,和解少阳的同时兼以活血通络、清热化痰、清泄阳明等,随邪之兼夹、病之轻重灵活加减。柴胡剂治疗偏头痛是值得研究的中医理论问题,临床经验仍需不断完善,笔者抛砖引玉,若有不妥之处,敬请不吝赐教。

参 考 文 献

- [1] GBD 2015 NEUROLOGICAL DISORDERS COLLABORATOR GROUP. Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990–2015: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015 [J]. *Lancet Neurol*, 2017(16): 877–897.
- [2] 李杲. 中医必读经典读书丛书·兰室秘藏[M]. 古籍医典编辑部, 主编. 北京: 中国中医药出版社, 2020: 79–80.
- [3] 徐荣谦, 王洪玲, 张虹, 等. “少阳为枢”是“少阳学说”理论的核心[J]. *中华中医药杂志*, 2008, 23(5): 373–375.
- [4] 刘雪颖, 王力苇, 刘美斯, 等. 基于张锡纯大气理论探讨头痛的病机及治疗[J]. *世界中医药*, 2022, 17(17): 2406–2409.
- [5] 方令. 张仲景柴胡剂药证方证探讨[D]. 南京: 南京中医药大学, 2013.
- [6] 刘向花, 李晓宁, 李树森. 大柴胡汤异病同治临床应用[J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(8): 3932–3934.
- [7] 陈萌, 吴中平, 邵家东. 辨方证使用大柴胡汤合桂枝茯苓丸治疗脑病探讨[J]. *中国中医急症*, 2018, 27(6): 1117–1120.
- [8] 马洁德. 柴胡桂枝干姜汤加减治疗偏头痛(肝郁脾虚证)的临床疗效观察[D]. 济南: 山东中医药大学, 2014.
- [9] 刘姝伶, 郑雨晓, 李磊, 等. 国医大师王庆国应用柴胡桂枝汤合甘麦大枣汤治疗围绝经期失眠经验[J]. *现代中医临床*, 2023, 30(1): 22–25.
- [10] 刘恒亮, 金子轩, 苏克雷, 等. 基于现代病理生理机制的柴

胡加龙骨牡蛎汤方证解读及临床运用体会[J]. *中国中药杂志*: 1–7.

- [11] 李云强, 陈冬雪, 黎明全. 黎明全应用柴胡加龙骨牡蛎汤治疗脑病经验辑要[J]. *浙江中医药大学学报*, 2023, 47(2): 219–221, 226.
- [12] 王政山, 沈福珍. 基于“少阳为枢”谈柴胡类方临床应用[J]. *环球中医药*, 2022, 15(8): 1393–1396.
- [13] 林朗华, 许雪仪, 张北平, 等. 黄穗平从枢机失运论治胃癌前病变的经验[J]. *广州中医药大学学报*, 2023, 40(4): 997–1001.
- [14] 胡济源, 张向伟, 柳红芳. 论“少阳为枢”的理论内涵[J]. *环球中医药*, 2018, 11(12): 1913–1915.
- [15] 邹凤娇, 赵昌林. 基于推陈致新理论探讨柴胡剂的应用[J]. *环球中医药*, 2021, 14(12): 2212–2215.
- [16] 汤怡婷, 陈玉鹏, 倪青. 从少阳三焦枢机探究宣通法论治糖尿病[J]. *北京中医药*, 2022, 41(11): 1268–1270.
- [17] 林朗华, 许雪仪, 张北平, 等. 黄穗平从枢机失运论治胃癌前病变的经验[J]. *广州中医药大学学报*, 2023, 40(4): 997–1001.
- [18] 祝之友. 神农本草经药物解读(一)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2017: 32–36.
- [19] 姜涛. 四种生血法对骨髓抑制小鼠血清TPO、EPO、gM-CSF及骨髓CD34~+影响的比较研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2014.
- [20] 徐薇, 刘秀华, 陈钢, 等. 从“少阳春生之气”理论探讨调肝生血法对放疗后小鼠造血功能的调控作用[J]. *时珍国医国药*, 2016, 27(1): 45–46.
- [21] 张晓莹, 王雄文. 柴胡及柴胡剂的“推陈致新”理论探析[J]. *长春中医药大学学报*, 2020, 36(6): 1097–1099.
- [22] 王宗水. 重用薏苡仁治疗痰湿型头痛[J]. *中医杂志*, 2011, 52(5): 432.
- [23] 仓志兰, 陆海芬. 符为民教授运用经方治疗偏头痛经验[J]. *中国中医急症*, 2019, 28(1): 138–140.
- [24] 李同同, 薛哲, 梁媛, 等. 基于“少阳为枢”探讨抑郁症从胆论治[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2022, 28(10): 1590–1592.
- [25] 蒋品媛, 刘松林, 周贤, 等. 梅国强教授运用柴胡类方辨治偏头痛临证经验[J]. *中医药导报*, 2022, 28(7): 148–150.
- [26] 赵开政, 刘松林, 岳滢滢, 等. 国医大师梅国强从肝辨治高血压病临证思路发微[J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(5): 2665–2668.

(收稿日期 2023–06–24)

(上接第214页)

- [15] LI YQ, TAN MS, WANG HF, et al. Common variant in PTK2B is associated with late-onset Alzheimer's disease: A replication study and meta-analyses[J]. *Neurosci Lett*, 2016(621): 83–87.
- [16] SUN YP, XING DQ, WANG XT, et al. Effect of Ang II on PDGF receptor expression in vascular smooth muscle cell[J]. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*, 2005, 21(2): 166–169.

- [17] CHU WW, GUAN LL, HUANG DH, et al. Lovastatin exerts protective effects on endothelial cells via upregulation of PTK2B[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12(3): 1741–1749.
- [18] GIRALT A, DE PINS B, CIFUENTES-DÍAZ C, et al. PTK2B/Pyk2 overexpression improves a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Exp Neurol*, 2018(307): 62–73.

(收稿日期 2023–07–27)